

Gudrun Engelhardt

2

ZUR ANWENDUNG
DER OUCHTERLONY-TECHNIK
BEI VIRUSINFEKTIONEN

1965

Frankfurt am Main 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546413_0098

Aus dem Universitätsinstitut für Zoonosenforschung
Frankfurt am Main

Direktor: Professor Dr. med. vet. G. S c h o o p

Zur Anwendung der O u c h t e r l o n y - Technik bei
Virusinfektionen.

Versuche zur besseren Darstellung von Antikörpern und
Antigenen, dargestellt am Beispiel der klassischen
Schweinepest.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Gudrun Engelhardt
aus Asch

Frankfurt am Main 1964



1. Referent: Prof. Dr. Schoop

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. May

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.65

Tag der Promotion: 29.7.65

Inhaltsverzeichnis

	Seite
V o r w o r t	8
S c h r i f t t u m	10
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	23
I. <u>M a t e r i a l u n d M e t h o d i k</u>	24
A. <u>M a t e r i a l</u>	24
B. <u>M e t h o d i k</u>	24
II. <u>E r g e b n i s s e</u>	35
A. <u>Das Antikörper - Additionsphänomen</u>	35
1. Vergleichende Untersuchungen von Patientenserum in Präzipitationssystemen mit und ohne Aktivatorserum	35
2. Das Verstärkungsphänomen beim Antikörpernachweis in verschiedenen Präzipitationssystemen, dargestellt an einem Schweinepesthyperimmunserum und an einem Rekonvaleszentenserum	37
3. Das Antikörper-Additionsphänomen, dargestellt am Beispiel eines Hyperimmunserums unter Verwendung eines einfachen Präzipitationssystems	38
B. <u>Versuche zur Erzielung optimaler Präzipitationen durch Variation des Durchmessers und des Abstandes der Reservoirs im Agar</u>	41
C. <u>Versuche zur Erhöhung der Präzipitinkonzentration in Immunseren</u>	44
1. Abwandlung der Ammoniumsulfatausfällung	44
2. Erhöhung der Gesamtserumkonzentration durch Lyophilisation	46
3. Konzentrierung der Gesamtserummenge durch Ultrafilterdialyse	47
D. <u>Anwendungsform von Serumkonzentraten</u>	49
E. <u>Vergleichende Untersuchungen an Immunseren mit Gammaglobulin- und Gesamtserumkonzentraten</u>	53

	Seite
D i s k u s s i o n	56
Z u s a m m e n f a s s u n g	62
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	64
Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	66
Ehrenwörtliche Erklärung	69
Lebenslauf	70

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Professor Dr.
G. S c h o o p für die Übertragung dieser Arbeit, sowie
für seine freundliche Unterstützung, herzlich zu danken.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Reg.vet.Rat
Dr. G. W a c h e n d ö r f e r für die Anleitungen und
Ratschläge, die er mir bei der Ausführung dieser Arbeit
zuteil werden ließ.

V O R W O R T

Bei der Diagnose von Viruserkrankungen im Agargel-Plattentest nach O u c h t e r l o n y , stellt die Erfassung geringer Antigen- oder Antikörpermengen ein Problem dar. In dieser Arbeit wurden Wege gesucht, auch niedrige Präzipitin- und Präzipitinogenanteile zum Nachweis zu bringen. Die Versuche wurden am Virus der klassischen Schweinepest als Beispiel vorgenommen.

S C H R I F T T U M

Das Erscheinen einer sichtbaren Präzipitationsbande im Agargel durch die Verbindung eines Antigens mit seinem entsprechenden Antikörper beruht nach C r o w l e (7) auf zwei Vorgängen. Wird identischen Antigenen und Antikörpern die Möglichkeit gegeben sich zu treffen, dann kommt es zunächst zur Ausbildung von Antigenen - Antikörperkomplexen (1. Phase). Dieser Vorgang nimmt nur wenig Zeit in Anspruch. Er ist spezifisch und reversibel, aber er führt nicht zur Sichtbarmachung der Verbindungen, da die entstandenen Komplexe zu klein sind.

In der zweiten oder Aggregationsphase bilden die Antigen - Antikörperkomplexe untereinander Netze und Gitter, welche an Größe allmählich zunehmen, ihre Löslichkeit verlieren und schließlich solche Ausmaße annehmen, daß sie sichtbar werden. Man nimmt an, daß die Antigen - Antikörperkomplexe aktive Molekülgruppen besitzen, welche zu einer Brückenbildung zwischen den Komplexen führen und daß es so zur Aggregation kommt. Die Unlöslichkeit und das Auftreten einer sichtbaren Präzipitation hängt von der Anzahl der hydrophoben und hydrophilen Gruppen an der Oberfläche des sich ausbildenden Gitterwerkes ab. Diese 2. Phase beansprucht mehr Zeit und ist weniger leicht reversibel als die 1. Phase. Beide Phasen verursachen keine tiefergreifenden chemischen Veränderungen von Antigen und Antikörper.

Manchmal kommt es zwar zur Ausbildung von Antigen - Antikörperkomplexen, aber nicht zur Aggregationsphase. Dies kann zum Beispiel der Fall sein, wenn einer der Reagenten im Überschuß vorhanden ist. Es kommt dann in der 1. Phase zur Absättigung aller aktiven Molekülgruppen des in kleinerer Menge vorhandenen Partners, und ein Gitter kann nicht mehr ausgebildet werden.

Die 1. Phase wird, obwohl sie auch ohne Anwesenheit von Elektrolyten stattfindet, durch deren Vorhandensein verstärkt. Einen optimalen pH-Bereich kann man nicht angeben, doch sind die Ergebnisse befriedigend, wenn man den pH-Wert den in vivo herrschenden Verhältnissen des Antikörpers angleicht. Für die meisten Antiserentypen scheint eine Temperatur von 15 - 40°C optimal zu sein (4).

Für die 2. Phase gilt, daß zur Ausbildung einer Aggregation Elektrolyte in der Regel vorhanden sein müssen. Ihre benötigte Konzentration ist abhängig von den einzelnen Systemen (1).

Liegt der pH-Wert niedriger als 6,5, erscheinen leicht unspezifische Reaktionen. Übersteigt er einen Wert von 8,2, so kann es zur Hemmung der spezifischen Reaktion und zur Auflösung von Antigen - Antikörperkomplexen kommen (7). Die Temperatur scheint auf die 2. Phase einen größeren Einfluß zu haben als auf die erste. Im allgemeinen vollziehen sich die Reaktionen bei einer Temperatur zwischen 0° und 4°C am vollständigsten, obwohl die Reaktionsspanne vom Gefrierpunkt bis 56°C reicht.

Einmal gebildete Präzipitationsbanden können wieder aufgelöst werden, wenn sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper ändert und wenn die Komplexbindung nicht zu stabil ist. Dies ist in großem Maße abhängig von der Art des Antigens und des Antikörpers (7, 19). Zum Beispiel bilden Pferdeantikörper mit aus Protein bestehenden Antigenen reversible Verbindungen. Besteht nun bei dieser Systemart Antigen- oder Antikörperüberschuß, so kommt es zur Hemmung oder Änderung der Antigen-Antikörperaggregation. Pferdeantikörper und Polysaccharidantigene oder Kaninchenantikörper und Protein- und Polysaccharidantigene bilden weniger reversible Komplexe als die anderer Tierarten. Ein Überschuß an Antikörpern führt bei ihnen nur zur teilweisen Hemmung der Präzipitation, und es kommt nur in sehr geringem Maße zur Dissoziation schon gebildeter Aggregate. Antigenüberschuß kann bei dieser Systemart in verschiedenem Grade die Präzipitation hemmen oder gebildete Aggregate lösen. Die Antikörper vom Pferdeantiproteintyp werden H - Typ oder Ausflockungsantikörper genannt, während die stabileren als R - Typ oder als präzipitierende Antikörper bezeichnet werden (7). Beide Arten von Antikörpern können auch beim Menschen auftreten (22).

Während zuerst von O u d i n zur Antigen-Antikörperpräzipitation im Gel Röhrchen verwendet wurden, die als Diffusionsmedium für die Präzipitine und Präzipitinogene Agar oder Gelatine enthielten, nahm Ö. O u c h t e r l o n y (19) für den selben Zweck durchsichtige Petrischalen, deren Boden mit einer

Agarschicht bedeckt wurde. In den Agar stanzte er Bassins, die als Antigen-Antikörperreservoir dienen. Die Präzipitationsbilder, die Ouchterlony in seinem Drei-Bassin-Plattentest erhielt, veranlaßten ihn, drei große Reaktionstypen zu unterscheiden. Ouchterlony verwendete eine Platte, in deren erstarrten Agar drei Bassins gestanzt worden waren. Jedes Bassin hatte eine Größe von 10 x 10 mm und eine Tiefe von 2 - 3 mm. Zwei Bassins wurden über das dritte untere gesetzt, so, daß die Ecken des unteren Bassins von den oberen einen Abstand von 7,1 mm hatten. Die beiden oberen Bassins trennte ein Abstand von 20 mm (Abb. 1).

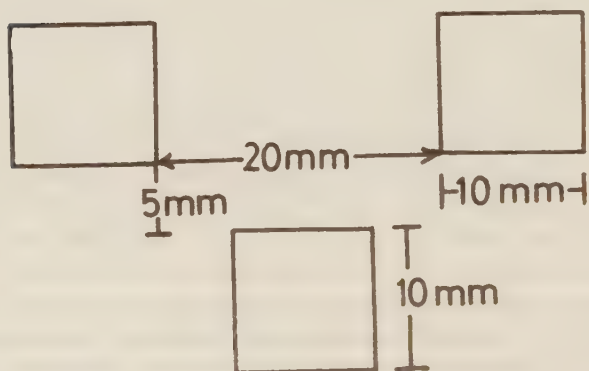


Abb. 1 Drei-Bassin-System nach Ouchterlony

In die beiden oberen Bassins wurde Antigen gebracht, während das untere Antikörpersubstanz enthielt.

1. Sind die beiden Antigene in den oberen Bassins identisch und entspricht die Antikörpersubstanz des unteren Bassins diesen Antigenen, dann entsteht folgendes Bild (Abb. 2):

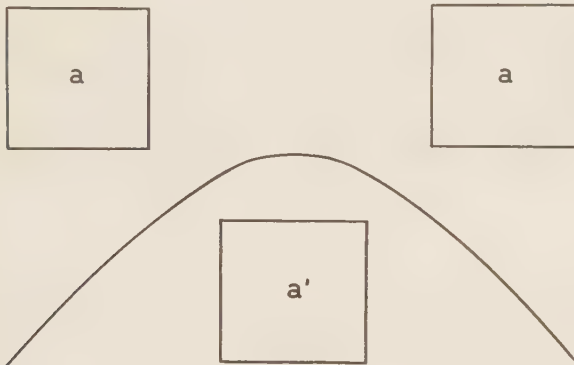


Abb. 2

Reaktionstyp 1, identisch

a = Antigen

a' = spezifische Antikörper zu a

Die Präzipitationsbanden entstehen an den Stellen im Agar, wo äquivalente Konzentrationen des Antigens und des Antikörpers aufeinandertreffen. Im Zwischenraum der drei Bassins bildet sich ein Bogen, der nicht in der Richtung der seitlichen Banden liegt, diese weichen vielmehr nach dem Zentrum hin ab. Es entsteht ein Bogen, der sich mit der offenen Seite zum Antikörperbassin zwischen dieses und die Antigenbassins legt. Die Ausbildung des Bogens bezeichnete Ouchterlony als Interferenzphänomen. Sie findet ihre Erklärung darin, daß in dem Zentrum zwischen den Bassins die Antigene aus den beiden oberen Bassins zusammentreffen. Bis die Antigene an diese Stelle gelangen, müssen sie eine größere Strecke im Agar zurücklegen als an den lateralen Bezirken, um auf eine gleichstarke Antikörperkonzentration zu treffen. Der Konzentrationsverlust durch den längeren Weg wird durch das Treffen der Antigene aus beiden Bassins ausgeglichen. Dadurch kommt es zur Abbiegung der

lateralen Präzipitationsbänden zum Zentrum hin und zur Ausbildung des Interferenzbogens. Ouchterlony nannte diese Reaktion "Reaktionstyp 1 identisch", da der Interferenzbogen nur entsteht bei Verwendung identischer Antigene (sogenannte Identitätslinie).

2. Werden in die beiden oberen Bassins zwei verschiedene Antigene gebracht, die serologisch nicht identisch sind, und in das untere Bassin eine Mischung von Antikörpern, welche sowohl Antikörper gegen das eine Antigen als auch Antikörper gegen das andere Antigen enthält, dann entsteht folgendes Bild (Abb. 3):

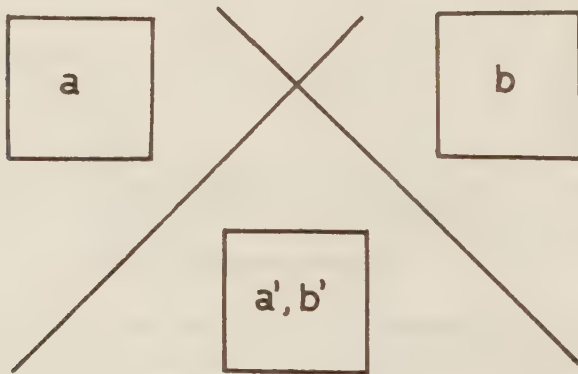


Abb. 3

Reaktionstyp 2, nicht identisch

a = Antigen

b = nicht mit a identisches Antigen

a' = spezifische Antikörper zu a

b' = spezifische Antikörper zu b

Bei diesem "Reaktionstyp 2, nicht identisch" kommt es nicht zur Ausbildung eines Interferenzbogens, sondern zur Kreuzung zweier verschiedener Präzipitationsbänder. Eine Kreuzung von Präzipitationsbändern kommt nur bei nicht identischen Systemen

vor. Dagegen stellt eine Präzipitationsbande für identische Systeme eine spezifische Barriere dar. Treffen auf eine schon gebildete Präzipitationsbande noch nicht gebundene Antigene der gleichen Art auf, dann werden sie von den ihnen entsprechenden Antikörpern abgefangen. Die Präzipitationsbande verstärkt sich. Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß Antigen und Antikörper in etwa korrespondierenden Konzentrationen vorliegen. Ist einer der Reagenten im Überschuß vorhanden, dann liegt die Präzipitationsbande da, wo äquivalente Konzentrationen aufeinandertreffen, also näher am Bassin des Reagenten mit niedriger Konzentration. Die Präzipitation kann aufgelöst und an anderer Stelle neugebildet werden; das gilt nur in der Theorie.

W i l s o n und P r i n g l e (26) wiesen auf die Bedeutung der absoluten und relativen Konzentrationen der Antigene und der Antikörper bei der Ausbildung der Präzipitationsbanden hin. Danach kommt es zu folgender Beeinflussung der Präzipitationslinien:

- a) Bei Ansteigen der relativen Antigenkonzentration nähern sich die Banden dem Antikörperreservoir, bei Erhöhung der relativen Antikörperkonzentration dem Antigenreservoir.
- b) Die Präzipitationslinien erscheinen länger, wenn die Antikörperkonzentration ansteigt.
- c) Kommt es zur gleichzeitigen Erhöhung der Konzentrationen von Antigenen und Antikörpern, dann verbreitern und verdichten sich die Banden.
- d) Die Präzipitationslinie neigt um so mehr dazu, sich in mehrere Streifen aufzuspalten, je stärker einer der Reaktionspartner ist, während es bei niedrigen Konzentrationen zur Verschmelzung kommt.
- e) Liegen die Reaktionskomponenten in niedriger Konzentration vor, dann erscheinen die Präzipitationen später.

3. Bringt man in die beiden oberen Bassins verwandte Antigene und in das untere Bassin Antikörper verschiedener Spezifität, dann erhält man folgendes Präzipitationsbild (Abb. 4):

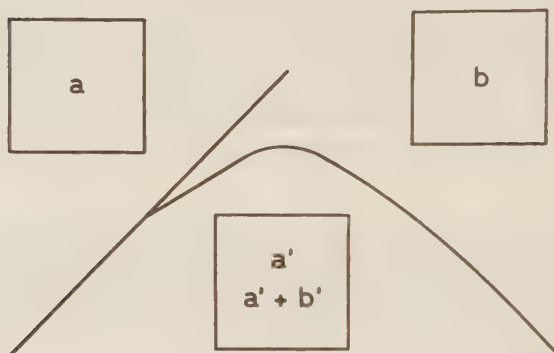


Abb. 4

Reaktionstyp 3, teilweise identisch

- a = Antigen
- b = mit a nicht identisches Antigen
- a' = spezifische Antikörper zu a
- a' + b' = unspezifische Antikörper

In dem unteren Bassin befinden sich Antikörper, die nur mit ihrem homologen Antigen präzipitieren können und solche, die sowohl mit dem homologen als auch mit dem nahe verwandten, aber heterologen Antigen zu präzipitieren vermögen. Bei diesem "Reaktionstyp 3, teilweise identisch" kommt es zunächst zur Ausbildung zweier seitlicher Präzipitationsbanden, die sich in einem Interferenzbogen treffen. Die Präzipitation der einen Seite enthält sowohl das homologe Antigen-Antikörpersystem als auch das heterologe. Für die streng spezifischen Antikörper stellt der Interferenzbogen keine Barriere dar. Sie wandern

weiter, bis sie auf das homologe Antigen mit äquivalenter Konzentration treffen. So kommt es zum geradlinigen Verlauf der Präzipitationsbande auf der Seite des homologen Antigens und damit zur Spornbildung.

Manche Antigen-Antikörperverbindungen können keine sichtbare Präzipitation bilden, weil ihre Konzentrationen zu niedrig sind, um den Schwellenwert zur Sichtbarkeit zu überschreiten. Kopräzipitierende Agentien können dazu führen, daß unsichtbare, unterschwellige Reaktionen erkennbar werden. Solche Agentien können entweder Antikörper (10, 23) oder Antigene (12, 9) sein. Zum Beispiel wurde bei der Histoplasmosediagnose (11) so verfahren: bekanntes Antiserum, welches Präzipitine gegen Histoplasmose enthielt, wurde in ein Reservoir einer Diffusionsplatte gebracht. In das benachbarte Reservoir war Antiserum gefüllt worden, von dem man erwartete, daß es Antikörper enthielt, deren Konzentration aber zu niedrig war, um eine Präzipitationsbande zu erzeugen. Beide Seren ließ man gegen Histoplasmoseantigen, welches sich in einem dritten Reservoir befand, diffundieren. Das bekannte Antiserum bildete eine geradlinige Präzipitationsbande zwischen sich und dem Antigen. Die Bande machte eine scharfe Krümmung weg von dem Reservoir mit dem schwach antikörperhaltigen Serum, als sie in dessen Diffusionsbereich kam. Diese Krümmung weist auf die unsichtbare Anwesenheit einer homologen Antigen-Antikörperreaktion in diesem Teilbezirk hin. Serum, welches keine Antikörper enthält, beeinflußt eine Präzipitationsbande in ihrem geradlinigen Verlauf nicht.

W o e r n l e (27) sah mit Antigenverdünnungen des Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner einen ähnlichen Verstärkungseffekt, wenn unterschwellige Antigenverdünnungen zwischen einem Antigen hoher präzipitinogener Aktivität aufgefüllt wurden. Er nannte diese Erscheinung Verstärkungsphänomen, ohne es praktisch auszuwerten.

Bei Untersuchungen mit präzipitierenden Antikörpern gegen das Virus der klassischen Schweinepest beobachtete man einen ähnlichen Additionseffekt, wenn ein homologes Antiserum mit

höherer Präzipitinkonzentration neben einem unterschwellig reagierenden Patientenserum aufgefüllt wurde (23). Dieses Antikörper-Additionsphänomen (W a c h e n d ö r f e r) bewirkte einerseits ein sichtbares Antigen-Antikörperaggregat trotz unterschwelliger Antikörperkonzentration. Andererseits führte es zur Reaktionsbeschleunigung und zur Verstärkung der Präzipitation. Daher wird in der serologischen Schweinepestdiagnostik grundsätzlich die Verwendung solcher "Aktivatorseren" empfohlen (23).

Bei der Diagnose der Tuberkulose (21) wurde im Röhrchentest ein Serum, welches Antikörper in zu niedriger Konzentration enthielt, in bestimmten Abständen zurückgezogen und frisches Serum aufgefüllt, so daß die notwendige Menge des Antikörpers erreicht wurde und es schließlich zur sichtbaren Präzipitation kam.

Außerdem kann es zur Verstärkung der Reaktionen kommen durch Konzentration der antikörperhaltigen Seren (14), durch spezifisch wirkende Kationen (5, 6) oder indem man Agargel Salzsäuredämpfen aussetzt (10). Man erhielt intensivere Banden, wenn nicht reagierende Proteine aus dem Agar gewaschen wurden und der Agar mit proteinpräzipitierenden Substanzen, wie Pikrinsäure, Essigsäure oder Trichloressigsäure (3) behandelt wurde.

Im Interferenzmikroskop kann man dem bloßen Auge unsichtbare Antigen-Antikörperaggregate entdecken (2). Klares Agargel zeigt im Interferenzmikroskop ein Muster von parallel verlaufenden Lichtstreifen, die mit dunklen Bändern abwechseln. Dieses Muster wird nicht verändert, wenn der Agar Antigen- und Antikörperlösungen enthält. Verbinden sich jedoch Antigene und Antikörper und bilden ein Aggregat, werden die Lichtstreifen in einer Ausdehnung, die der des gebildeten Aggregates entspricht, unterbrochen und weisen Unregelmäßigkeiten auf. So ist es möglich kleinere Aggregate, welche die Sichtbarkeitsgrenze nicht überschreiten, mit dem Interferenzmikroskop zu entdecken.

Die Agarpräzipitation nach Ouchterlony dient nicht nur zur Differenzierung verschiedener Proteinlösungen, sondern sie wird auch zu sonstigen immuno-biologischen Untersuchungen herangezogen. Neben ihrer diagnostischen Anwendung bei bakteriellen Erkrankungen gelang es, die Methode in den letzten Jahren in steigendem Umfang als Diagnostikum bei virusbedingten Krankheiten einzusetzen. In die Schweinepestdiagnostik wurde dieses Verfahren 1954 von Molnar (18) eingeführt und seitdem mit gutem Ergebnis angewandt von Paarmann und Ernst (20), Schoop und Wachendörfer (23), Mansi und King (17) u.a. Mansi (16) empfahl, als Antigenquelle die Bauchspeicheldrüsen erkrankter Schweine zu verwenden.

Je nach den Krankheitsstadien, in welchen sich die Tiere befinden, kommen entweder das Virusantigen oder die diagnostischen Antikörper zur Untersuchung. In akuter Krankheitsphase sind die Präzipitinogene nachweisbar (8, 17, 23). Im weiteren Krankheitsverlauf verschwindet das Antigen, es treten die diagnostischen Antikörper auf. Aus Untersuchungen von Schoop und Wachendörfer (23) konnten folgende Zahlenverhältnisse entnommen werden. In der akuten Krankheitsphase gelang der Präzipitinnachweis bei 46% der Tiere, 8,8% zeigten eine verdächtige Reaktion. Präzipitierende Antikörper waren in dem gleichen Stadium nur in 3% der Fälle nachweisbar. Befanden sich die Tiere im Stadium der Rekonvaleszenz, dann war der Antigennachweis nur noch in 6,8% der Fälle zu erbringen. Dagegen konnten die Präzipitine in der 3. - 5. Krankheitswoche bei 32% nachgewiesen werden, 8% zeigten verdächtige Reaktionen. In der 6. - 12. Woche nach Auftreten der Krankheitssymptome war der Nachweis der präzipitierenden Antikörper bei 90% der Tiere positiv und bei 2,5% verdächtig.

Der Erfolg der Methode bei der Diagnose virusbedingter Erkrankungen ist in hohem Maße abhängig einerseits von optimalen Testantigenen und andererseits von der Aufarbeitung der Antisera. Da nach den bisher vorliegenden Erfahrungen (25) bei Bauchspeicheldrüsen mit schwach präzipitierender Aktivität der

Präzipitingehalt vieler Immunseren zur Erfassung aller antigenhaltiger Drüsen nicht ausreicht, sind Maßnahmen erforderlich, die Präzipitinkonzentration zu erhöhen. Weiterhin liegen auch die präzipitierenden Antikörper in Patientenseren nach natürlicher Infektion, in relativ niedriger Konzentration vor, so daß ihre Erfassung entweder durch eine Anreicherung der Gamma-Globuline oder durch Anwendung des Antikörper-Additionsphänomens ermöglicht werden muß.

Diese Verhältnisse, die von grundsätzlicher Bedeutung bei der Virusdiagnostik im Agargel sind, sollten am Beispiel des Schweinepestvirus und der korrespondierenden Antikörper in dieser Arbeit untersucht werden.

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I. Material und Methodik

A. Material

1. Serum: Als Antikörperquelle wurden von mir alle Seren verwendet, die im Institut für Zoonosenforschung zur Verfügung standen. Sie waren vorher im Agargeltest geprüft worden und hatten mit Schweinepestantigen Präzipitationsbanden gebildet. Außerdem wurden die Seren, die zur Klärung einer abgelaufenen Schweinepesterkrankung, dem, dem Institut für Zoonosenforschung angegliederten Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt eingesandt worden waren, getestet und in die Untersuchungen mit einbezogen.
2. Als Testseren kamen die Hyperimmunseren der Behring-Werke in Marburg, Op.-Nr. 671 beziehungsweise 178, zur Anwendung.
3. Das negative Kontrollserum stammte von Schweinen, die nicht an Schweinepest erkrankt waren.
4. Antigen: Bauchspeicheldrüsen von Schweinen, die von dem Schweinepestvirus befallen und entweder gestorben oder geschlachtet worden waren, dienten als Antigen. Da M a n s i (16) das Pankreas des Schweines als Antigenquelle empfohlen hat und in anderen Organen der Antigennachweis nicht befriedigt (20, 23), wurde nur diese als Antigenspender herangezogen. Als Antigen wurden nur solche Bauchspeicheldrüsen verwendet, die zuvor im Agargel-Plattentest geprüft worden waren.
5. Als negatives Kontrollantigen dienten Bauchspeicheldrüsen von gesunden Schweinen.

B. Methodik

1. Serum: Der starke Lipoidgehalt der Schweineseren, der im phenolhaltigen Diffusionsmedium zu einer diffusen Trübung des Agars und zur Ausbildung unspezifischer Präzipitationen führt, konnte durch Chloroformreinigung, wie W o e r n l e (27) sie empfohlen hat, beseitigt werden.

Die Seren wurden zu gleichen Teilen mit Chloroform versetzt und im Zellhomogenisator (Fa. Bühler, Tübingen) so lange homogenisiert, bis es zur Emulgierung kam. Das Emulgat wurde dann

bei 10 000 U/Min. 30 Minuten lang in der Pirouette (Rotor II), (Fa. Phywe, Göttingen) zentrifugiert. Der klare Überstand stellte das gereinigte Serum dar, während der Bodensatz von einer weiß-gelblichen Chloroform-Lipoidschicht gebildet wurde.

Damit auch geringe Antikörpermengen des Serums im Test nachgewiesen werden können, hat W o e r n l e (27) die Aussalzung der Serumglobuline mit Ammoniumsulfat empfohlen. Deshalb wurden die Seren nach der Chloroformreinigung mit Ammoniumsulfat behandelt.

Zu 2,5 ml des Patientenserums wurden 2,5 ml Aqua dest. und 5 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gegeben, entsprechend einer Halbsättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat. Die Halbsättigung mit Ammoniumsulfat stellt für Serumglobuline den optimalen Fällungsbereich dar (15). Die trübe Flüssigkeit wurde bei 10 000 U/Min. 30 Minuten lang in der Pirouette (Rotor II) zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt worden war, wurde das Röhrchen mit dem globulinhaltigen Bodensatz vorsichtig 3 x mit Aqua dest. ausgespült. Der bröckelige Rückstand wurde dann in 1 ml Aqua dest. aufgelöst.

Sowohl die Chloroformreinigung als auch die Aussalzung mit Ammoniumsulfat wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Das auf diese Weise bearbeitete Serum wurde dann im Agargel-Plattentest geprüft.

2. Bei dem Testserum brauchte keine Chloroformreinigung vorgenommen zu werden, da es sich als frei von störenden Lipiden erwies. Dagegen war es zweckmäßig, entweder die Globuline anzureichern oder das gesamte Serum zu konzentrieren.

Die Serumkonzentrierung wurde auf zwei Arten durchgeführt:

a) Lyophilisation:

2,5 ml des Testserums wurden lyophilisiert und das Lyophilisat mit 1,25 ml Aqua dest. gelöst, was der Hälfte der Ausgangsmenge entspricht. Dasselbe wurde mit weiteren 2,5 ml des Testserums wiederholt, nur wurde jetzt das Lyophilisat in 0,83 ml Aqua dest. aufgenommen. Auf diese Weise gelang es, eine zwei- und eine dreifache Konzentration des Testserums herzustellen.

b) Ultrafilterdialyse:

Apparatur: Es wurde das Ultrafilter LKB 6300 A der LKB-Produkte AB, Stockholm verwendet. Das Ultrafilter besteht aus einem Nylongerüst, über welches ein Dialysierschlauch gezogen wird. Das Nylongerüst ist oben mit einem Gummistopfen verschlossen. In dem Stopfen befindet sich eine Öffnung, durch die ein Evakuierungsrohr in das Nylongerüst einzuführen ist. Das Evakuierungsröhrchen wird nur so tief in das Nylongerüst geschoben, daß es etwa 1,5 cm über dessen Boden steht. Dieses Röhrchen wird mit Hilfe eines Gummischlauches an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Die Apparatur wird in einen Meßkolben gehängt, der das zu konzentrierende Serum enthält. Durch den Unterdruck, der in dem Dialysierschlauch entsteht, erfolgt eine beschleunigte Dialyse des Serums. Der Dialysenschlauch hat eine ungefähre Porengröße von 24 Å. Serumproteine mit ihrem durchschnittlichen Querdurchmesser von 40 Å und dem meist viel größeren Längsdurchmesser (15) können den Schlauch also nicht passieren.

Als Ausgangsmenge wurden 40 ml Hyperimmunserum verwendet. Nach etwa 2 1/2 Stunden war die Serummenge auf die Hälfte eingeeengt. An diesem Punkt der Dialyse wurden 4 ml entnommen. Bei dem Punkt der dreifachen Einengung des Serums wurden wiederum 4 ml entnommen. Als das Serum bis auf den fünften Teil seines Ausgangsvolumens konzentriert worden war, wurde die Dialyse beendet. Der Fehler, der durch zweimalige Entnahme von 4 ml Serum entstand, ist bei der Konzentrationsberechnung des Serums berücksichtigt worden. Der gesamte Vorgang dauerte fünf bis sechs Stunden. Zu Anfang war das ganze Filter von Serum umgeben gewesen, je mehr jedoch der Serumspiegel sank, um so kleiner wurde die dialysierfähige Oberfläche und entsprechend verlängerte sich die Dauer der Dialyse. Die aus dem Serum gesaugte Flüssigkeit, die noch nicht gänzlich durch das Evakuierungsrohr abtransportiert worden war, wurde im Agargeltest geprüft. Es entstand keine Präzipitation. Der pH-Wert des Serums war nach abgeschlossener Dialyse der gleiche, wie zu Anfang.

3. Antigen: Die Bauchspeicheldrüsen wurden von Fett und Bindegewebe befreit, sorgfältig zerkleinert und die Gewebstückchen in die Reservoirs gebracht.

4. Agar: Der Präzipitationsagar wurde in Anlehnung an Darbyshire (8) folgendermaßen hergestellt: zu 1000,0 ml einer physiologischen Kochsalzlösung mit einem Phenolzusatz von 0,5% wurden 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,56 g NaH_2PO_4 und 15,0 g Agar-Agar pulv. sub. Merck gegeben. Darauf wurde diese Mischung 15 Minuten lang im Autoklaven bei 120°C erhitzt, im Dampftopf filtriert und auf einen pH von 7,0 eingestellt. 20 ml des Agars wurden in Anumbra-Schalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. Die Schalen lagerten vor ihrer Verwendung mindestens 48 Stunden im Kühlschrank. In den erstarrten Agar wurden dann die Reservoirs gestanzt und zwar in eine Schale vier Systeme, wobei jedes System sieben Reservoirs umfaßt (Abb. 5):

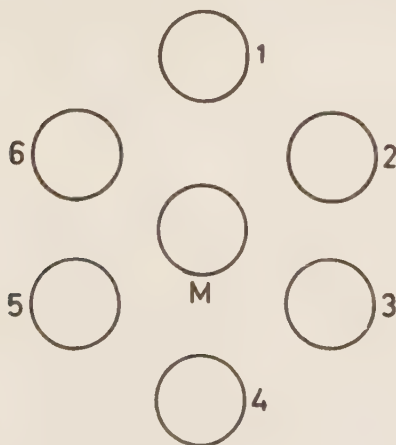


Abb. 5 Hexagonales Präzipitationssystem nach
K a m i n s k i (13)

Jedes dieser Reservoirs hat einen Durchmesser von 6 mm und der Abstand zwischen den einzelnen Reservoirs beträgt 4 mm. Der Boden der Stanzlöcher wurde mit einem Tropfen flüssigen Agars bedeckt. In Anlehnung an die Angaben von V i l l e - m o n t und P r o v o s t (24) wurde im Laufe der Untersuchungen dem Agar Methylenblau zugesetzt und zwar 0,33 ml einer 0,1%igen wäßrigen Methylenblaulösung auf 20 ml Agar. Der Agar erhielt dadurch eine hellblaue Färbung, während die Präzipitationsstreifen ihre milchig-weiße Farbe behielten. Durch den so entstandenen Farbkontrast zeichneten sich die Präzipitationsbanden schärfer ab.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Seren in drei verschiedenen Systemarten getestet. In allen drei Systemen ist die Reservoiranordnung die gleiche, nur die Reservoirfüllungen unterscheiden sich.

In dem System nach E r n s t (A) befindet sich in den Reservoirs 1 und 3 bekanntes, positives Schweinepestantigen, in den Reservoirs 2 und 4 das zu prüfende Patientenserum, im mittleren Reservoir das bekannte präzipitierende Serum, in Reservoir 5 negatives Kontrollpankreas und in Reservoir 6 negatives Kontrollserum (Abb. 6).

In dem System (B) nach S c h o o p und W a c h e n d ö r - f e r nimmt Reservoir 1 und 3 das Hyperimmunserum (= Aktivatorserum) auf, Reservoir 2 und 4 das zu prüfende Patientenserum, das mittlere Reservoir positives Testantigen, Reservoir 5, wie bei System A, negatives Kontrollpankreas und Reservoir 6 wieder negatives Kontrollserum (Abb. 6).

System C enthält kein Aktivatorserum. Reservoir 1 und 3 werden mit Normalserum beschickt, Reservoir 2, 4 und 6 mit dem zu prüfenden Patientenserum, das mittlere Reservoir mit positivem Kontrollantigen und Reservoir 5 mit negativem Kontrollpankreas (Abb. 6).

Schematische Darstellung der Systeme :

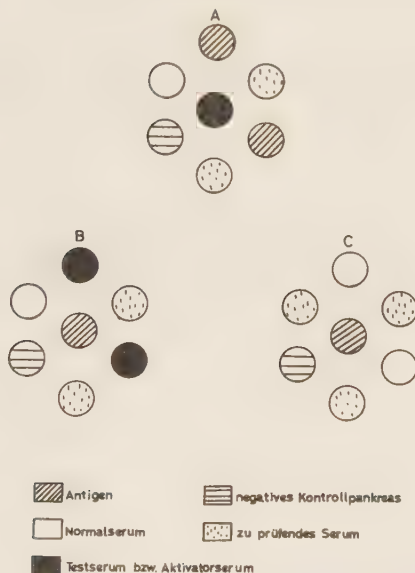


Abb. 6 A = System nach Ernst
 B = System nach Schoop und
 Wachendorfer
 C = System ohne Aktivatorserum
 Numerierung der Reservoirs wie
 in Abbildung 5.

In System A treten bei positiv reagierendem Patientenserum Präzipitationsstreifen zwischen Reservoir 1 und dem mittleren Reservoir auf, zwischen Reservoir 1 und 2, zwischen 2 und 3, zwischen 3 und Mitte und zwischen dem Reservoir 3 und 4. Das

Antigen verbindet sich also nicht nur mit den Antikörpern des Testserums, sondern auch mit denen des Patientenserums. Die Antikörper sind identisch, da die Präzipitationslinie zwischen dem Immunserum und dem Antigen fließend und einen Bogen bildend in diejenige zwischen dem zu prüfenden Serum und dem Antigen übergeht (19) (Abb. 7a).

Ein Serum ist verdächtig, wenn die Präzipitationsbande zwischen dem positiven Pankreas und dem Hyperimmunserum bis nahe an das Reservoir mit dem zu prüfenden Serum heranreicht und sich, zunächst tangential verlaufend, am Rand des Reservoirs verliert (Abb. 7b).

Dagegen enthält das Patientenserum keine präzipitierenden Antikörper, wenn die Bande zwischen Reservoir 1 und Mitte in gerader Linie bis zu dem Reservoir mit dem zu prüfenden Serum verläuft (Abb. 7c).

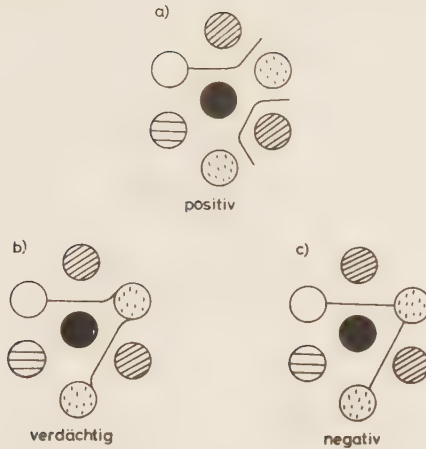


Abb. 7 Schematische Darstellung der Reaktion in System A beim Präzipitinnachweis. Numerisierung der Reservoirs wie in Abbildung 5.

Bei System B sind die Reaktionen im Prinzip die gleichen. Bei Antikörpergehalt des Patientenserums gegen das Schweinepestvirus, treten Präzipitationsbanden zwischen den peripheren Reservoirs 1 - 4 und dem zentralgelegenen Reservoir auf. Alle diese Banden gehen, indem sie einen Bogen bilden, ineinander über (Abb. 8a).

Bei fraglichem Antikörpergehalt des zu prüfenden Serums kommt es wieder zur Abbiegung der Präzipitationslinie zwischen dem Antigen und dem Hyperimmunserum, diesmal aber zur Mitte hin (Abb. 8b).

Das Präzipitationsbild gleicht bei fehlendem Antikörpergehalt des Patientenserums völlig dem entsprechenden des Systems A (Abb. 8c).

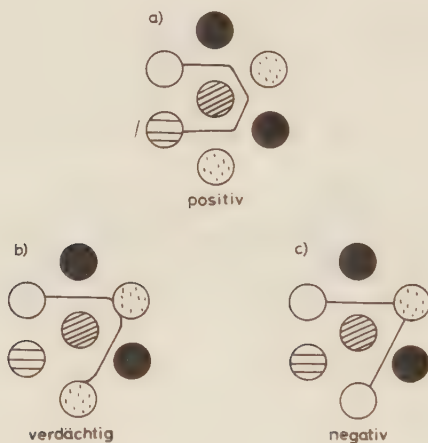


Abb. 8 Schematische Darstellung der Reaktionen beim Präzipitinnachweis in System B. Numerierung der Reservoirs wie in Abbildung 5.

Haben die geprüften Patientenserum präzipitierende Antikörper, so bilden sich im System C die Präzipitationsbanden zwischen Reservoir 2, 4, 6 und dem mittleren Reservoir aus und zwar kommen sie mehr oder weniger in die Mitte zwischen Patientenserumreservoir und Antigenreservoir zu liegen (Abb. 9a).

Sind zwischen Reservoir 2, 4, 6 und dem mittleren Reservoir unscharf begrenzte Trübungen zu entdecken, die nahe am Serumreservoir gelegen sind, so wird dies als verdächtige Reaktion gewertet (Abb. 9b).

Bei negativer Reaktion der Patientenserum treten keinerlei Banden in System C auf.

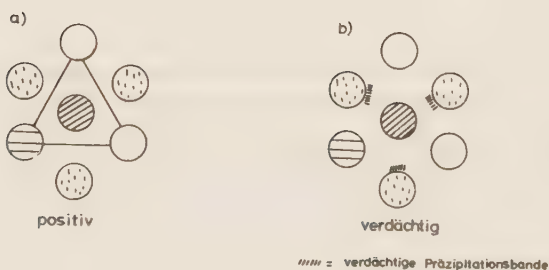


Abb. 9 Schematische Darstellung der Reaktionen beim Präzipitinnachweis in System C. Numerierung der Reservoire wie in Abbildung 5.

Die Beurteilung der positiven Reaktionen wurde so vorgenommen, daß deutlich sichtbare Präzipitationsbanden von geringer Dichte mit + bewertet wurden, stärkere Banden mit ++ und Präzipitationen noch höherer Intensität mit +++. Doch erschien es nötig eine weitere Abstufung vorzunehmen, indem die Bewertungen +/- und ++/+++ mit einbezogen wurden.

Verdächtige Reaktionen wurden als ± bezeichnet.

Die Antigenreservoirire wurden mit einem ungefähr erbsgroßen Stück Pankreas gefüllt, in der Weise, daß die Gewebemassen dicht mit den Reservoirirändern abschlossen. Die Serumreservoirire faßten 0,04 - 0,05 ml Serum. Die Anumbraschalen wurden abgedeckt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 24 Stunden erfolgte die erste Ablesung. Danach wurden die Serumreservoirire frisch gefüllt, da die Flüssigkeit meist nach 24 Stunden in den Agar diffundiert und verdunstet war. Enthielten die Reservoirire aber noch Flüssigkeit, so wurde diese mit Hilfe einer Pipette entnommen. Nach 48 Stunden wurde zum zweiten Mal abgelesen und aufgefüllt. Nach 72 Stunden wurde mit der endgültigen Beurteilung der Versuch abgeschlossen. Die Reaktionen hatten nach 72 Stunden ihren optimalen Entwicklungsstand erreicht. Wurden die Platten länger als 72 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, ohne sie nochmals aufzufüllen, so zeigten manche noch nach 10 bis 14 Tagen ein unverändertes, gut ablesbares Präzipitationsbild. Dies war jedoch abhängig von dem Grad der bakteriellen Zersetzung der verwendeten Bauchspeicheldrüsen und von der herrschenden Luftfeuchtigkeit im Raum.

Das Ablesen der Präzipitationen erfolgte in einem abgedunkelten Raum mit Hilfe einer Mikroskopierlampe im parallelen Strahlengang unter einem Winkel von ungefähr 45 Grad.

II. Ergebnisse

A. Das Antikörper - Additionsphänomen

In diesen Versuchen sollte die Anwendungsmöglichkeit des Antikörper-Additionsphänomens bei dem serologischen Antikörpernachweis geprüft werden.

1. Vergleichende Untersuchungen von Patientenseren in Präzipitationssystemen mit und ohne Aktivatorseren.

Versuchsanordnung:

Insgesamt wurden 221 Seren in den drei oben angegebenen Systemen geprüft. System A und B enthielten Aktivatorserum in verschiedener Anordnung, während das dritte System zum Vergleich mit präzipitinfreiem Normalserum aufgefüllt wurde.

Das Hyperimmunserum der Behringwerke, Op-Nr. 671, diente als Aktivatorserum.

Ergebnis:

Von den geprüften Seren erwiesen sich 49 (22%) als positiv und 6 (2,8%) als verdächtig. Bei den übrigen 166 Seren (75,2%) kam es zu keiner sichtbaren Präzipitation. Von den 49 positiv reagierenden Seren zeigten alle deutliche Präzipitationsbanden im System B. Im System A reagierten 48 der 49 Seren positiv, während ein Serum eine verdächtige Reaktion ergab. In dem System ohne Aktivatorserum hingegen konnten die gleichen Seren nur in 41 Fällen eine Präzipitationsbande bilden. Ein Serum zeigte einen fraglichen Präzipitingehalt und sieben der Seren reagierten überhaupt nicht. In der Tabelle 1 sind diese Ergebnisse einander gegenübergestellt.

Tab. 1 Vergleichende Untersuchungen an 49 Seren mit Präzipitiergehalt unter Verwendung verschiedener Präzipitationssysteme.

	pos. reagierende Seren	verdächtig reagierende Seren	neg. reagierende Seren
System A	48 (98,0%)	1 (2,0%)	0
System B	49 (100,0%)	0	0
System C	41 (83,7%)	1 (2,0%)	7 (14,3%)

Von den 41 Seren, welche in dem System ohne Aktivatorserum eine positive Reaktion ergaben, war die Intensität der Banden bei 30 (= 73,2%) schwächer und bei 11 Seren (= 26,8%) gleich stark wie in den Systemen mit Aktivatorserum.

Bei 4 Seren (= 9,5%) traten die Präzipitationsbanden im System C 24 Stunden später auf als in den Systemen A und B. 1 Serum (= 2,4%) zeigte im System C 24 Stunden früher eine Reaktion als in den Systemen A und B.

Von sechs verdächtig reagierenden Seren in System B wiesen in System A vier Seren keine Reaktion auf, zwei Seren zeigten ebenfalls verdächtige Reaktionen. In dem System ohne Aktivatorserum konnte bei diesen Seren in keinem Fall der Antikörpernachweis erbracht werden (Tab. 2).

Tab. 2 Vergleichende Untersuchungen an 6 Seren mit fraglichem Präzipitiergehalt unter Verwendung verschiedener Präzipitationssysteme.

	pos. reagierende Seren	verdächtig reagierende Seren	neg. reagierende Seren
System A	0	2	4
System B	0	6	0
System C	0	0	6

Die Ergebnisse zeigen, daß in dem System C Seren, die in den anderen Systemen noch eine verdächtige Reaktion ergeben, dem Nachweis völlig entgehen. Auch eine Anzahl von Seren, die in den Systemen mit Aktivatorserum deutlich positiv reagieren, liefern entweder nur schwache Präzipitationen oder können in System C nicht erfaßt werden.

2. Das Verstärkungsphänomen beim Antikörpernachweis in verschiedenen Präzipitationssystemen, dargestellt an einem Schweinepesthyperimmunserum und an einem Rekonvaleszenzserum.

Anhand von Verdünnungsreihen des Hyperimmunserums Op.-Nr. 178 und des Rekonvaleszentenserums 7088 sollte das Antikörper-Additionsphänomen deutlich gemacht werden.

Versuchsanordnung:

Die einzelnen Verdünnungsstufen des Testserums und des Rekonvaleszentenserums wurden in den Systemen A, B und C geprüft.

Ergebnis:

Aus Tabelle 3 sind die Präzipitationen der Testserumverdünnungen zu entnehmen.

Tab. 3 Prüfung einiger Verdünnungsstufen des Testserums Op.-Nr. 178 in Systemen mit und ohne Aktivatorserum

Testserum	System A	System B	System C
unverdünnt	+	+ / ++	+ / ++
1 : 2	+	+	+
1 : 4	$\pm$	+	-
1 : 8	-	+	-
1 : 16	-	$\pm$	-

Es wird auch hier wieder die Wirkung des Antikörper-Additionsphänomens deutlich. In System C kommt es nur bis zu der Verdünnungsstufe 1:2 zu der Bildung einer Präzipitationsbande. In System A geht die Präzipitation eine Verdünnungsstufe weiter und in System B tritt noch eine, wenn auch sehr schwach sichtbare, Reaktion ein bei der Verdünnungsstufe 1:16.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Rekonvaleszentenserumverdünnungen.

Tab. 4 Prüfung einiger Verdünnungsstufen des Rekonvaleszentenserums 7088 in Systemen mit und ohne Aktivatorserum

Serum 7088	System A	System B	System C
unverdünnt	+	+ / ++	+
1 : 2	+	+	+
1 : 4	<u>+</u>	<u>+</u>	-
1 : 8	-	<u>+</u>	-
1 : 16	-	-	-

Bei dem Patientenserum 7088 kommt es in dem System ohne Aktivatorserum ebenfalls bis zu der Verdünnung 1:2 des Serums zu einer Präzipitation. In dem System A wird die Verdünnungsstufe 1:4 und in dem System B werden die Stufen 1:4 und 1:8 noch erfaßt.

3. Das Antikörper-Additionsphänomen, dargestellt am Beispiel eines Hyperimmunserums unter Verwendung eines einfachen Präzipitationssystems.

Zur weiteren Deutlichmachung des Antikörper-Additionsphänomens wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 des Immunserums Op.-Nr. 671 hergestellt und diese in einer einfachen Systemanordnung geprüft.

Versuchsanordnung:

Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden zunächst fortlaufend in die Reservoirs eines hexagonalen Systems gebracht (Abb. 10 A). In dem zweiten System war die Anordnung insofern anders, als

zwischen den Reservoiren mit den einzelnen Verdünnungsstufen jeweils ein Reservoir mit unverdünntem Immuns serum gefüllt wurde (Abb. 10 B). Das Antigen war in beiden Fällen das gleiche.

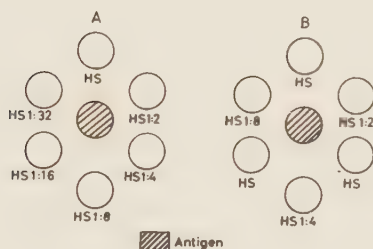


Abb. 10 Schematische Darstellung zweier einfacher Präzipitationssysteme

A = fortlaufende Anordnung der Serumverdünnungen

B = Anordnung der Serumverdünnungen unter Anwendung des Additionsphänomens

HS= Hyperimmuns serum Op.-Nr. 671

Ergebnis:

Tab. 5 Reaktionen einer Immunserumverdünnungsreihe nach 24, 48 und 72 Stunden mit (B) und ohne (A) Aktivatorserum

HS	A Ergebn. n. 24 ^h	B Ergebn. n. 24 ^h	A Ergebn. n. 48 ^h	B Ergebn. n. 48 ^h	A Ergebn. n. 72 ^h	B Ergebn. n. 72 ^h
unver- dünnt	+	+	+	++	++	+++
1 : 2	+	+	+	++	++	+++
1 : 4	-	+	+	++	++	+++
1 : 8	-	±	+	+	+	++
1 : 16	-	-	+	+	+	+
1 : 32	-	-	-	+	-	+

HS = Hyperimmunserum Op.-Nr. 671

Unter dem Einfluß des Aktivatorserums kommt es bei den Verdünnungsstufen 1:4 und 1:8 24 Stunden früher zu einer Reaktion als bei dem System ohne Aktivatorserum. Bei Abschluß des Versuches zeigen die Seren, in deren Nachbarschaft unverdünntes Immunserum diffundierte, stärkere und um eine Stufe weitergehende Präzipitationen (Tab. 5).

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen den Einfluß von stark antikörperhaltigen Seren auf solche mit geringerem Antikörpergehalt.

Sowohl in System A als auch in System B kommt es mit ein und denselben Seren zu besseren Präzipitationen als in System C. Die besseren Ergebnisse in System B als in System A, sowohl hinsichtlich der höheren Nachweisrate als auch, was aus den Tabellen 1 und 2 nicht zu entnehmen ist, der zu mindest in einem Teil der Fälle in System B beobachteten stärkeren Intensität der Präzipitationsbanden, könnte sich wie folgt erklären lassen.

Die in diesen Versuchen verwendeten Bauchspeicheldrüsen hatten einen hohen Antigengehalt. Während in System B nur ein Antigenreservoir auf ein Reservoir mit Patientenserum kommt, dem jeweils zwei Reservoir mit Aktivatorserum benachbart sind, stehen in System A zwei Antigenreservoir einem Patientenserum- und einem Aktivatorserumreservoir gegenüber. Es könnte sein, daß das in der Systemanordnung A in zweifacher Menge verwendete Pankreas zu einem Antigenüberschuß führt, wenn starke Antigene verwendet werden. Ein Antigenüberschuß kann aber, wie eingangs besprochen, zu einer Beeinträchtigung der Präzipitationen führen. In System B wird es dagegen, unter den gleichen Bedingungen, zu optimalen Reaktionen kommen können.

Dementsprechend müßte es bei Verwendung schwächerer Antigene in System A zu optimalen Präzipitationen kommen. In System B dagegen wäre dann ein Antikörperüberschuß vorhanden, der wiederum zu ungünstigen Präzipitationsbedingungen führen würde. Vergleichende Untersuchungen in System A und B mit schwächeren Antigenen zur Bestätigung dieser Vermutung konnten nicht vorgenommen werden, da entsprechende Bauchspeicheldrüsen nicht zur Verfügung standen.

Die Systeme A und B wären demnach gleichwertig. Ihre Anwendung könnte je nach den zur Verfügung stehenden Antigenen variiert werden. Das System B hat allerdings den einen Vorteil, daß nur ein Reservoir mit Antigen gefüllt werden muß.

Da es bei dem augenblicklichen Verlauf der Schweinepestkrankung schwierig ist, eine größere Anzahl antigenreicher Bauchspeicheldrüsen zu bekommen, ist dem System B der Vorzug zu geben.

B. Versuche zur Erzielung optimaler Präzipitationen durch Variation des Durchmessers und des Abstandes der Reservoir im Agar.

Die Banden schwach antikörperhaltiger Seren können so nahe an den Serumreservoirrand rücken, daß sie nur mit Mühe erkennbar sind. Diese Beobachtung gab die Veranlassung dazu, die Reservoirabstände zu verändern, um auch solche Reaktionen noch gut wahrnehmen zu können. Bei diesen Abstandsveränderungen

sollte es natürlich nicht zu einer Abschwächung der bisher gut sichtbaren Präzipitationen kommen. Auch wurde durch Änderung der Reservoirdurchmesser und der Abstände untersucht, ob dadurch andere und bessere Präzipitationsbedingungen geschaffen werden können, als das mit den bisher verwendeten möglich war.

In Tabelle 6, in welcher die variierten Abstände zwischen den Reservoiren und ihre Durchmesser angegeben sind, werden gleichzeitig auch die Ergebnisse zusammengefaßt.

Das Hauptaugenmerk wurde zunächst auf den Reservoirdurchmesser von 6 mm gelegt, der in den bisherigen Untersuchungen in Gebrauch war. Wurde der bisher benutzte Abstand von 4 mm auf 5 mm erhöht, so waren die Präzipitationen noch genauso gut wie bei dem Abstand von 4 mm. Doch schon bei einer Vergrößerung des Abstandes um 2 mm traten die Präzipitationen 24 Stunden später auf und hatten geringere Intensität. Eine Vergrößerung des Reservoirabstandes kommt also nur bis zu 5 mm in Frage, wenn man nicht gleichzeitig eine Verschlechterung der Präzipitation normalstarker Antigen-Antikörperverbindungen in Kauf nehmen will.

Bei einer Vergrößerung des Reservoirdurchmessers kommt es zu keiner Verbesserung der Präzipitation, wohl aber steigt der Materialverlust relativ stark an.

Reservoire mit kleineren Durchmessern und damit geringerem Volumen geben kein befriedigendes Ergebnis. Da auch entsprechend der Reservoirabstand verkürzt werden muß, werden außerdem die Präzipitationsbilder zu unübersichtlich. Hat das Antigenreservoir einen anderen Durchmesser als das Serumreservoir, so treten keine Veränderungen in der Präzipitation auf gegenüber gleich großen Reservoiren.

Aus diesen Untersuchungen resultiert, daß bei einem Durchmesser der Reservoire von 6 mm und einem Abstand von 4 bis 5 mm die günstigsten Voraussetzungen für eine optimale Präzipitation gegeben sind.

Tab. 6 Versuche zur Erzielung optimaler Präzipitationen durch Variation des Durchmessers und des Abstandes der Reservoirs im Agar

Durchmesser d. Reservoirs in mm		Abstand d. Reservoirs in mm	Volumen d. Reservoirs in ml	Ergebn. n. 24 ^h	Ergebn. n. 48 ^h	Ergebn. n. 72 ^h
4		3	0,01-0,02	+	+	++
4		4		-	+	+ / ++
4		7		-	-	-
6		3	0,04-0,05	+	+	++ x
6		4		+	++ / +++	+++
6		5		+	++ / +++	+++
6		6		-	+ / ++	++ / +++
6		7	0,07	-	+	++ / +++
7		3		+	++	+++ x
7		4		+ / ++	++	+++
7		6,5		+	+	++
7		7		+	+	++
7		9		+	+	++
Anti- gen	Serum					
7	9	5	0,10	+	+ / ++	+++
7	9	6		+	+ / ++	++
7	9	7		+	+ / ++	++

x Bande dicht am Serumreservoir

C. Versuche zur Erhöhung der Präzipitinkonzentration in Immunseren.

1. Abwandlung der Ammoniumsulfatausfällung

Wurden die Globuline antikörperhaltiger Seren mit Ammoniumsulfat ausgefällt, so konnte beobachtet werden, daß die unverdünnte Globulinfällung eine stärkere Präzipitation erzeugte, als das unbehandelte Serum. Stellte man Verdünnungsreihen von den zu untersuchenden Seren her, so ergab sich, daß die unbehandelten Seren bei höheren Verdünnungsstufen noch Reaktionen zeigten, während die Globulinfällungen keine Präzipitation mehr bildeten, oder es wurde zwar die gleiche Verdünnungsstufe erreicht, aber die Präzipitationsbande war schwächer. Der Fall, daß eine durch Ammoniumsulfatbehandlung gewonnene Globulinanreicherung eine höhere Verdünnungsstufe erreichte, als das unbehandelte Serum, trat fast nie ein. Aus diesem Grunde wurde versucht, durch Abwandlung der Ausfällungsmethode bessere Ergebnisse zu erlangen.

Die auf folgende Weise behandelten Seren wurden im Agargeltest vergleichend geprüft:

- a) (als HS bezeichnet):
unbearbeitetes Hyperimmunserum
- b) (als HS1 bezeichnet):
bisher angewandte Aussalzungsmethode
2,5 ml HS - 2,5 ml Aqua dest. - 5 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, 30 Minuten lang zentrifugieren bei 10 000 U/Min. Überstand abkippen, 3 x vorsichtig spülen mit Aqua dest., Rückstand in 1 ml Aqua dest. auflösen.

Diese Art der Ausfällung wurde so abgewandelt, daß entweder die Menge des zur Verdünnung verwendeten destillierten Wassers, die Auflösungsmenge Aqua dest. oder die Ammoniumsulfatmenge geändert wurde.

- c) (als HS2 bezeichnet):
2,5 ml HS - 5 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- d) (als HS3 bezeichnet):
2,5 ml HS - 2,5 ml Aqua dest. - 7,5 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- e) (als HS4 bezeichnet):
2,5 ml HS - 7,5 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.

- f) (als HS5 bezeichnet):
2,5 ml HS - 2,5 ml Aqua dest. - 10 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- g) (als HS6 bezeichnet):
2,5 ml HS - 10 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- h) (als HS7 bezeichnet):
2,5 ml HS - 2,5 ml Aqua dest. - 2,5 ml Ammoniumsulfatlösung, Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- i) (als HS8 bezeichnet):
2,5 ml HS - 2,5 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 1 ml Aqua dest.
- j) (als HS9 bezeichnet):
2,5 ml HS - 2,5 ml Aqua dest. - 5 ml Ammoniumsulfatlösung. Auflösung des Rückstandes mit 0,5 ml Aqua dest.

Ergebnis:

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 7 Reaktionen der Globulinlösungen, gewonnen nach Abwandlung der Ammoniumsulfatausfällung

Testserum	HS	HS1	HS2	HS3	HS4	HS5	HS6	HS7	HS8	HS9
unverdünnt	+	+++	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++
1 : 2	+	+++	++	++	++	+/++	++	++	++	+++
1 : 4	+	++	+	+	+	+/++	+	+/++	+	++
1 : 8	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
1 : 16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Das unbehandelte Serum bildet transparente Banden, die aber dennoch deutlich zu erkennen sind. Die Präzipitationsbanden der mit Ammoniumsulfat behandelten Seren sind dagegen milchig weiß und undurchsichtig. Bei keinem Serum, dessen Globuline mit Ammoniumsulfat gefällt worden waren, konnte eine Titersteigerung erzielt werden. Bei unvorsichtiger Spülung des Zentrifugenrückstandes kam es zu wesentlich schlechteren Präzipitationen.

Diese unbefriedigenden Ergebnisse führten zur Suche nach anderen Konzentrierungsmöglichkeiten der Seren.

2. Erhöhung der Gesamtserumkonzentration durch Lyophilisation

Da weder durch die Aussalzung der Globuline mit Ammoniumsulfat noch durch die Abwandlung der Ammoniumsulfatausfällung eine Titersteigerung der Seren in den vorliegenden Versuchen erreicht werden konnte, wurde das Hyperimmunserum Op.-Nr. 671 durch Lyophilisation auf das zwei- und dreifache seiner Ausgangsmenge konzentriert.

Versuchsordnung:

Von dem zwei- und dreifachen Gesamtserumkonzentrat wurden Verdünnungsreihen bis 1:32 hergestellt.

Jeweils drei Verdünnungsstufen wurden so in einem hexagonalen Präzipitationssystem untergebracht, daß neben einem Reservoir, in welchem sich das Serum befand, ein Reservoir frei blieb oder mit den negativen Kontrollen gefüllt war. Das mittlere Reservoir enthielt das Antigen. Jeder Serumverdünnungsstufe wurde zweimal die Möglichkeit gegeben, mit ein und demselben Antigen zu reagieren, indem die Systeme doppelt angesetzt wurden.

Die Verdünnungsreihen der zwei- und der dreifachen Gesamtserumkonzentration hatten die Möglichkeit mit vier Bauchspeicheldrüsen zu präzipitieren.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8, 9 und in der Abbildung 11 enthalten.

Die Konzentration des Serums durch Lyophilisation führt zu einer Präzipitationsverstärkung und zu einer Titersteigerung. Das mit Aqua dest. aufgelöste Lyophilisat war allerdings stark eingedickt, besonders bei der dreifachen Konzentration des Serums. Infolge der honigähnlichen Konsistenz des Präparates bereitete die Entnahme Schwierigkeiten. Die unverdünnte Stufe der dreifachen Konzentration des Serums bildete einen Trübungshof um das Serumreservoir. Dadurch wurde die Ablesung der Präzipitationsbande beeinträchtigt und nach 72 Stunden oft unmöglich.

3. Konzentrierung der Gesamtserummenge durch Ultrafilterdialyse

Eine weitere Konzentrierungsmöglichkeit der Gesamtserumproteine wird durch die Ultrafilterdialyse der Seren gegeben. Das Ziel war auch hier eine Titersteigerung der Seren und stärkere Präzipitationen zu erreichen.

Versuchsordnung:

Von den durch Dialyse gewonnenen zwei-, drei- und fünffachen Serumkonzentrationen wurden Verdünnungsreihen bis zu der Stufe 1:32 hergestellt. Als Antigen dienten die gleichen vier Bauchspeicheldrüsen, wie in dem Versuch mit den lyophilisierten Seren. In den Test wurden zum Vergleich Verdünnungsreihen des unbearbeiteten Immunserums (Op.-Nr. 671) und des mit Ammoniumsulfat behandelten Serums der gleichen Charge einbezogen. Die übrige Versuchsordnung erfolgte wie bei 2.

Ergebnis:

Tabelle 8 enthält die nach 72 Stunden erzielten Endtiter.

Tab. 8 Endpräzipitationen verschiedener Konzentrationen des Immunserums Op.-Nr. 671

Antigen	HS	HS A	U2	L2	U3	L3	U5
1130	1 : 4	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 16	1 : 32	1 : 16
1077	1 : 4	1 : 8	1 : 8	1 : 16	1 : 16	1 : 16	1 : 32
647/6	1 : 8	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 32	1 : 32	1 : 32
1367/IV	1 : 4	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 16	1 : 16	1 : 32

Tab. 9 Durchschnittliche Titersteigerung verschiedener Serumauferarbeitungen gegenüber dem Ausgangspräparat

	HS A	U2	L2	U3	L3	U5
Verdünnungsstufen	0,25	1,00	2,00	2,00	2,25	2,50

Erklärung zu Tabelle 8 und 9:

HS = Immunserum Op.-Nr. 671, HS A = mit Ammoniumsulfat behandeltes Immunserum, U2 = zweifach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum, L2 = zweifach durch Lyophilisation konzentriertes Immunserum, U3 = dreifach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum, L3 = dreifach durch Lyophilisation konzentriertes Immunserum, U5 = fünffach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum.

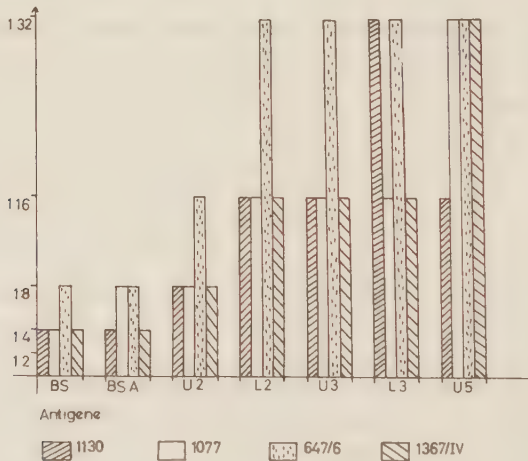


Abb. 11

Schematische Darstellung der präzipitierenden Aktivität einiger Serumspräparationen.

BS = Immunserum Op.-Nr. 671

BSA = mit Ammoniumsulfat behandeltes Immunserum

übrige Zeichenerklärung wie bei Tabelle 8 und 9.

In Abbildung 11 wird die wachsende Titersteigerung der Seren proportional ihrer steigenden Konzentrationen deutlich. Außerdem kam es, was aus den Tabellen nicht hervorgeht, bei den höhertitrigen Seren zu einer Verstärkung der Präzipitationsbanden und zu einem früheren Erscheinen der Präzipitationen.

Auch bei der Einengung des Serums durch Ultrafilterdialyse auf das drei- und fünffache der Ausgangsmenge, trat bei den unverdünnten Stufen eine Hofbildung um die Serumreservoirs ein. Die Ablesung der Reaktionen wurde dadurch mehr oder minder stark beeinträchtigt.

D. Anwendungsform von Serumkonzentraten

Die Beeinträchtigung der Präzipitationsbanden in den unverdünnten Stufen der starken Serumkonzentrationen durch die Ausbildung eines Hofes im Agar, machte es notwendig, nach einer geeigneten Gebrauchsverdünnung zu suchen. Diese Verdünnungsstufe sollte folgende Forderungen erfüllen:

- 1) Die Hofbildung mußte auf ein Minimum reduziert sein.
- 2) Das Serum sollte gegenüber einer möglichst großen Skala Bauchspeicheldrüsen unterschiedlichen Antigengehaltes wirksam werden.

Versuchsanordnung:

Zu diesem Zweck wurden von den durch Ultrafilterdialyse gewonnenen zwei-, drei- und fünffachen Serumkonzentrationen die Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:8 mit neun Bauchspeicheldrüsen getestet. Zum Vergleich wurden die gleichen Verdünnungsstufen des unbearbeiteten Immuserums und des mit Ammoniumsulfat behandelten Serums angesetzt.

Ergebnis:

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Es konnte für alle neun Bauchspeicheldrüsen übereinstimmend festgestellt werden, daß die Präzipitationsbanden bis zu der Verdünnung 1:4 der zweifachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse, sofern sie nicht in der Mitte lagen, auf das Antikörperreservoir zu verschoben waren. Von der 1:2 Verdünnung

der zweifachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse anlagen die Banden dagegen näher am Antigenreservoir, wenn sie sich nicht in der Mitte gebildet hatten.

Nach den Angaben von Ouchterlony (19), Wilson und Pringle (26) würde auf Grund dieser Ergebnisse bei dem unbearbeiteten Immuns Serum, dem mit Ammoniumsulfat behandelten Serum und bei den Verdünnungsstufen 1:4 und 1:8 der zweifachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse Antigenüberschuß herrschen und von der 1:2 Verdünnung der zweifachen Serumkonzentration an Antikörperüberschuß (siehe Abbildung 12).

In Abbildung 12 soll die Verlagerung der Präzipitationsbanden bei Antigen- und Antikörperüberschuß, wie sie von Ouchterlony (19), Wilson und Pringle (26) angegeben wurde, deutlich gemacht werden.

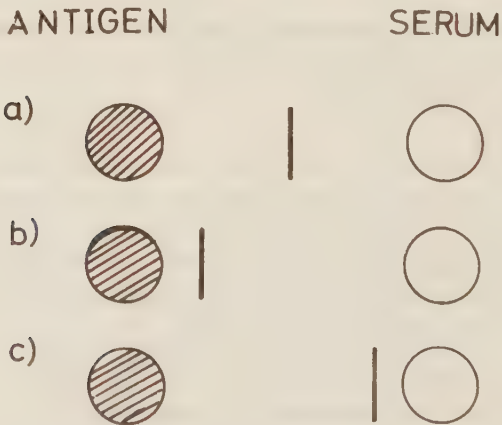


Abb. 12 Schematische Darstellung der Präzipitationsbandenlokalisation bei

- a) Konzentrationsgleichgewicht
- b) Antikörperüberschuß
- c) Antigenüberschuß

Tab. 10 Auswertung einer geeigneten Gebrauchsverdünnung von hochkonzentrierten Immunsere

Pankreas	HS			HS A			U2			U3			U5		
	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8
656 D 6	+++	+	+	++	-	-	+++	++	++	+++	++	++	++	++/+++	+++
541/6	++	++	-	++	++	-	++/+++	++	-	+++	++	+	++	+++	++/+++
2239 V	+/++	+/++	-	+	-	-	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
541/3	++	++	+	++	++	-	++/+++	++	+	++	++	++	++	++	+
180/14	+/++	++	+	+	++	-	++	-	-	++	++	++	++	++	+
541/2	++	+	-	++/+++	-	-	++/+++	+	++	++	++	++	++	++	+
180/12	++	++	-	-	-	-	++	+/++	-	-	-	-	++	+	+
181/4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+/++	++	+
B VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/++	++	+

Erklärung wie bei Tabelle 8 und 9

In Tabelle 11 wird die prozentuale Verteilung von Konzentrationsgleichgewicht, Antigen- und Antikörperüberschuß in den einzelnen Serumkonzentrationen des Versuches der Tabelle 10 angegeben.

Tab. 11 Prozentuale Verteilung von Konzentrationsgleichgewicht, Antigen- und Antikörperüberschuß bei Präzipitationen zwischen verschiedenen Immunserumkonzentrationen und neun Bauchspeicheldrüsen

	HS	HS A	U2			U3	U5
			1:2	1:4	1:8		
Antigenüberschuß	78%	75%	25%	15% 40%		-	-
Konzentrationsgleichgewicht	22%	25%	7%	19% 41%	15%	52%	37%
Antikörperüberschuß	-	-	-	-	19%	48%	63%

Erklärung: HS = Immunserum Op.-Nr. 671
 HS A = mit Ammoniumsulfat behandeltes Immunserum
 U2 = zweifach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum
 U3 = dreifach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum
 U5 = fünffach durch Ultrafilterdialyse konzentriertes Immunserum

Wie die Tabelle zeigt besteht am häufigsten Konzentrationsgleichgewicht bei der dreifachen Serumkonzentration. Bei der Verdünnung 1:2 ist die Hofbildung stark reduziert, so daß es zu keiner Störung der Präzipitation mehr kommt. Von den neun geprüften Bauchspeicheldrüsen zeigen sieben gute Präzipitationen. Das Pankreas B VI kann von der dreifachen Konzentration

des Immunserums durch Ultrafilterdialyse noch nicht erfaßt werden. Da aber die Mehrzahl der untersuchten Antigen-Antikörperkomplexe bei dieser Konzentrationsstufe ein Konzentrationsgleichgewicht aufweisen, scheint sie die günstigste zu sein, um eine möglichst breite Skala von Bauchspeicheldrüsen mit unterschiedlichem Antigengehalt zum Nachweis zu bringen. Die fehlenden Präzipitationen bei den Verdünnungen 1:2 und 1:4 des Pankreas 180/12 könnten möglicherweise auf einer unterschiedlichen Antigenverteilung im Pankreas beruhen. Eine weitere Ursache für das Zustandekommen derartiger negativer Reaktionen soll später diskutiert werden. Die Verdünnungsstufe 1:2 der dreifachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse scheint daher eine geeignete Gebrauchsverdünnung darzustellen.

Der starke Antikörperüberschuß der fünffachen Gesamtserumkonzentration durch Ultrafilterdialyse läßt es nicht ratsam erscheinen, diese für Routineuntersuchungen zu verwenden.

E. Vergleichende Untersuchungen an Immunseren mit Gamma-Globulin- und Gesamtserumkonzentraten

Versuchsanordnung:

- a) Von den Behringwerken wurde eine Gamma-Globulinlösung (Nr. 1) aus dem Immunserum der Op.-Nr. 178 dem Institut zur Prüfung überlassen. Von ihr sollte die Höhe des Präzipitationstiters bestimmt werden.

Zum Vergleich wurden die drei- und fünffache Serumkonzentrationen des Immunserums Op.-Nr. 178, die durch Ultrafilterdialyse gewonnen worden waren, und das unbehandelte Serum der gleichen Charge angesetzt. Es wurden Verdünnungsreihen bis 1:64 hergestellt und den Seren die Möglichkeit gegeben, mit vier Antigenen zu präzipitieren.

- b) In einem zweiten Versuch kam eine weitere Gamma-Globulinlösung (= Nr. 2) der Behringwerke zur Prüfung.

Der Versuchsaufbau war der gleiche wie bei a), nur wurden zum Teil andere antigenhaltige Bauchspeicheldrüsen verwendet.

Ergebnis:

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Versuche a) und b) enthalten.

Die Gamma-Globulinlösung Nr. 1 erreicht eine durchschnittliche Titerhöhe von 1:32 mit den geprüften Antigenen. Die Reaktionen liegen hinsichtlich ihrer Intensität zwischen denen der drei- und fünffachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse.

Die Titersteigerung der Gamma-Globulinlösung Nr. 2 gegenüber dem unbehandelten Immunserum entspricht derjenigen der fünffachen Serumkonzentration durch Ultrafilterdialyse.

Von den unverdünnten Stufen der Globulinlösung Nr. 1 und Nr. 2 werden ebenfalls Höfe um das Serumreservoir erzeugt, allerdings sind diese transparent und interferieren nicht mit den Präzipitationsbanden.

Die verhältnismäßig schlechtere Präzipitation des Pankreas 656 D6 im Versuch b) als in a), erklärt sich daraus, daß bei dem zweiten Versuch nur noch eine geringe Menge dieser Bauchspeicheldrüse zur Verfügung stand.

Einige der in Tabelle 12 gezeigten Reaktionen sind in den Serumangangsverdünnungen von schwacher Intensität oder fehlen ganz. Bei höheren Verdünnungsstufen verstärken sich die Präzipitationen dann, um bei weiterer Verdünnung des Serums wieder schwächer und schließlich negativ zu werden. Auffällig ist dabei, daß es sich in der Mehrzahl der Fälle um Präzipitationen zwischen Bauchspeicheldrüsen mit schwächerem Antigengehalt und Immunseren hoher Konzentration handelt. Die starken Antigene 1077 und 656 D6 des Versuches a) weisen keine derartigen Reaktionen auf.

Tab. 12

Beziehungen zwischen Präzipitinkonzentration und Antigennachweisrate

Anti- gen	Immunserum unbehandelt							F-Globulinlösung Nr.1 ●							Serumkonzentrat 0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	Verdünnungen							Verdünnungen							3 fach																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	32	64	Verdünnungen							Verdünnungen																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
656 D6	+++	++++	++++	++++	+++	+	-	+++	++++	++++	++++	+++	++	+								+++	++++	++++	++++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

x = reziproker Wert der Serumverdünnung

⊕ = Globulinkonzentrat

o = Serumkonzentrat der Ultrafiltratlyse

O = Hofbildung

D i s k u s s i o n

V i l l e m o n t und P r o v o s t (24) empfahlen die Färbung des Präzipitationsagars mit Methylenblau. Nach ihren Beobachtungen führt es zu früherem Erscheinen und zur Verstärkung der Präzipitationsbanden. Bei den hier vorgenommenen Untersuchungen kam es weder zu einer stärkeren noch zu einer früher eintretenden Präzipitation, wenn der Agar Methylenblau enthielt. Die hellblaue Farbe des Agars bildete aber einen guten Kontrast zu den nicht gefärbten milchig-weißen Präzipitationsbanden, wodurch diese schärfer hervortraten. Auf Grund dessen wurde der Methylenblauzusatz weiterhin beibehalten.

Die Änderung der Reservoirdurchmesser und Abstände zeigte, daß die optimalen Präzipitationen dann erreicht wurden, wenn bei einem Reservoirdurchmesser von 6 mm ein Abstand von 4 bis 5 mm gewählt worden war. Waren die Reservoirdurchmesser kleiner, mußten gleichzeitig auch die Abstände verringert werden. Hierdurch entstand ein unübersichtliches Präzipitationsbild. Wurden nur die Abstände vergrößert und ein Reservoirdurchmesser von 6 mm beibehalten, dann traten die Banden später auf und zeigten geringere Intensität. Eine Vergrößerung des Reservoirdurchmessers brachte einen zu großen Materialverlust, ohne zu einer Verstärkung der Reaktionen zu führen.

Das Antikörper-Additionsphänomen tritt auf, wenn stark antikörperhaltige Seren in der direkten Nachbarschaft von Seren mit schwachen aber identischen Antikörpern diffundieren. Es wurde in dieser Arbeit auf seine Verwendbarkeit in der serologischen Diagnostik geprüft. Die Entstehung des Antikörper-Additionsphänomens könnte man sich folgendermaßen vorstellen. Die Antikörper diffundieren von dem Reservoir aus radiär in den Agar. Die Präzipitine des starken Serums müssen sich irgendwann mit den Antikörpern des schwachen Serums treffen und deren Konzentration im Agar erhöhen. Entweder kommt es jetzt zur sichtbaren Präzipitation zwischen dem schwachen Antikörper und dem Antigen, oder zumindest zu einer Ablenkung der Bande des Aktivatorserums.

Bei den hier vorgenommenen vergleichenden Untersuchungen an 221 Patientenseren enthielten 49 Seren = 22% präzipitierende Antikörper gegen das Schweinepestvirus. Davon wären 14,3% nicht erfaßt worden, wenn an Stelle des Aktivatorserums Normalserum in dem Test verwendet worden wäre. Daraus geht hervor, daß ohne Anwendung des Antikörper-Additionsphänomens etwa jedes 7. Serum mit unterschwelliger präzipitierender Aktivität dem Nachweis entgehen würde. Außerdem kommt es dabei zur Beschleunigung und Intensivierung der Reaktion, wodurch neben der diagnostischen Breite des Agargel-Plattentestes auch seine Sicherheit erhöht wird.

Von einem Antikörper-Additionsphänomen sollte grundsätzlich dann gesprochen werden, wenn ein additiver Effekt durch gleichwertige Antikörper erzielt wird, wie es in dem von S c h o o p und W a c h e n d ö r f e r empfohlenen Präzipitationssystem zu beobachten ist.

Wurden die zur Addition führenden Aktivatorserummengen zu Gunsten des Präzipitinogens reduziert (Präzipitationssystem, empfohlen von E r n s t), so wirkte sich das ebenfalls günstig für den Antikörpernachweis aus. Der Erhöhung des Präzipitinogenanteils sind jedoch bei serologischen Untersuchungen größeren Umfangs zur Zeit Grenzen gesetzt, da die Beschaffung geeigneter Testantigene Schwierigkeiten bereitet. Für die Aufbereitung von Aktivatorseren stehen dagegen kommerzielle Immunseren in ausreichender Menge zur Verfügung. Auf Grund dieser praktischen Erwägungen und anhand der Tatsache, daß die besseren Ergebnisse mit der von S c h o o p und W a c h e n d ö r f e r angewandten Anordnung der Reaktionskomponenten erzielt wurden, ist dieser der Vorzug zu geben.

Der Präzipitingehalt der Patientenseren reicht oft nicht aus, um eine deutlich sichtbare Präzipitationslinie im Agargeltest zu erzeugen. Aus diesem Grunde war man dazu übergegangen (27, 23), die Serumglobuline anzureichern. Aber nicht nur für die Patientenseren erwies sich eine Anreicherung als vorteilhaft, sondern auch für Immunseren, deren Aktionsbreite dadurch vergrößert werden kann.

Eine Methode zur Erhöhung der präzipitierenden Aktivität der Seren stellt die von W o e r n l e bei präzipitinhaltigen Seren empfohlene Ausfällung der Globuline mit Ammoniumsulfat dar. Eigene Untersuchungen mit der Ammoniumsulfataussalzung führten nicht, oder nur geringfügig zur Erhöhung der Präzipitationsaktivität. Die Gründe für diese unbefriedigenden Ergebnisse mögen methodischer Art sein. W o e r n l e gab an, daß der Zentrifugenrückstand, also die gefällten Globuline, gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden soll. Wurde aber so verfahren, dann löste sich ein Teil des Bodensatzes vorzeitig ab und ging verloren. Diese Spülung mit Aqua dest. schließt immer einen gewissen Unsicherheitsfaktor ein. Deshalb wäre es möglicherweise besser, das restliche Ammoniumsulfat durch Dialyse zu entfernen. Das würde wiederum zur Verlängerung des ganzen Vorganges führen, sodaß die Methode für Routineuntersuchungen an Wert verlöre. W o e r n l e empfiehlt, vor der Hinzugabe des Ammoniumsulfates die Verdünnung des Serums mit gleichen Teilen Aqua dest. In den hier durchgeführten vergleichenden Versuchen, bei denen die Seren einmal verdünnt mit Ammoniumsulfat versetzt wurden und einmal unverdünnt, das heißt andere Konzentrationsverhältnisse geschaffen wurden, konnte festgestellt werden, daß die Ergebnisse mit verdünnten Seren etwas besser waren. Trotz eingehenden Literaturstudiums, ist es nicht gelungen, eine Erklärung hierfür zu finden.

Diese Beobachtung könnte nach H o f m e i s t e r (15) folgendermaßen zu deuten sein:

Die Aussalzung stellt eine Dehydrierung der Proteine dar. Der Dipol, Wasser, wird von den Salzen angezogen. Dadurch bildet sich ein Mantel aus Wassermolekülen um das Salzion und die Proteine werden aus diesen Verbindungen herausgedrängt und fallen aus. Sind von Anfang an zu wenig Wassermoleküle vorhanden, so wird die Wasserhülle um die Salzionen nicht dicht genug sein und einige Proteine bleiben noch in Lösung. Ist aber von vornherein ein genügender Wassergehalt vorhanden, sodaß der Mantel um die Salzionen lückenlos gebildet werden kann, dann wird dadurch ein hohes Maß der Proteinausfällung gewährleistet sein. Diese Fragen bedürfen aber noch einer genaueren Klärung.

Die Lyophilisation der Seren und die Auflösung des Lyophilisates in einer gegenüber dem Ausgangsvolumen verringerten Menge Aqua dest. stellt eine einfache und schnelle Methode zur Erhöhung der Serumproteinkonzentration dar. Bei den kleinen Mengen, die bei den Patientenseren sehr oft vorliegen, wäre dieses Verfahren insofern praktisch, als man nur eine geringe Ausgangsmenge benötigt. Andererseits ist die Methode bei der wechselnden Anzahl der Seren, die zur Untersuchung eingeschickt werden, in einem Routinebetrieb schlecht realisierbar.

Mit Hilfe der Ultrafilterdialyse ist es gelungen, die Seren stark zu konzentrieren und eine beträchtliche Titersteigerung zu erreichen. Sie nimmt mehr Zeit in Anspruch als die Lyophilisation, vor allem aber werden bei der Größe des im Handel befindlichen Ultrafilters größere Serummengen benötigt. Da bei Patientenseren in der Regel nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, kleinere Ultrafilter aber, soweit bekannt ist, nicht im Handel sind, scheidet diese Art der Serumkonzentration für Patientenseren aus. Anders liegen die Verhältnisse bei Immunsereen. Für sie bietet die Dialyse mit dem Ultrafilter eine gute Konzentrierungsmöglichkeit. Höher konzentrierte Immunsereen verstärken 1. den Additionseffekt bei Seren mit schwacher oder unterschwelliger präzipitierender Aktivität und 2. führen sie zur Erfassung schwächerer Antigene, welche mit unkonzentrierten Immunsereen noch keine Präzipitation bilden. Diese Beobachtung soll im folgenden näher diskutiert werden.

Sowohl die Antigene als auch die Antikörper werden bei der Diffusion durch das Agar gel verdünnt. Läßt man nun ein schwaches Antigen und unkonzentriertes Hyperimmunserum gegeneinander diffundieren, so werden die in relativ stärkerer Konzentration vorliegenden Antikörper in der Mitte zwischen den beiden Reservoiren nicht auf äquivalente Konzentrationen des Antigens stoßen. Obgleich Antigen-Antikörperkomplexe entstehen, bildet sich hier keine sichtbare Präzipitation, da diese 1. Reaktionsphase nach C r o w l e reversibel ist und damit die Antigen-Antikörperkomplexe löslicher Natur sind. Die Antikörper wandern weiter und werden dabei immer mehr verdünnt.

Auf dem weiteren Diffusionsweg werden die Antikörper einmal die Stelle erreichen, wo sie Antigene mit gleicher Konzentration antreffen. Es kommt schließlich zur Bildung von stabilen Antigen-Antikörperkomplexen (Aggregationsphase). Die Konzentration der Komplexe ist aber so niedrig, daß sie nicht imstande sind, eine sichtbare Präzipitation zu erzeugen.

Läßt man jetzt ein höhertitriges Hyperimmunserum gegen ein schwaches Antigen diffundieren, dann müssen diese Antikörper eine größere Strecke im Agar zurücklegen als diejenigen des nichtkonzentrierten Serums, um auf eine äquivalente Antigenkonzentration zu stoßen. Die Stärke der Antigen-Antikörperkomplexe wird jetzt größer sein als im ersten Fall, weil

- 1) die Ausgangskonzentration des Serums bedeutend höher war, so daß bei stärkerer Verdünnung des Serums durch den weiteren Weg im Agar doch noch eine höhere Konzentration des Antikörpers am Ort der Äquivalenz beider Partner besteht,
- 2) der Ort der stabilen Komplexbildung in einem Bereich liegt, wo das Antigen in stärkerer Konzentration vorliegt.

Es wird jetzt zu einer sichtbaren Präzipitation kommen können. Die Präzipitationsbande wird aber näher am Antigenreservoir gelegen sein als die unsichtbare Komplexbildung des nichtkonzentrierten Serums.

Wenn die Konzentration des Hyperimmunserums aber zu hoch ist, werden die Antikörper am Antigenreservoir anlangen, ohne auf eine äquivalente Konzentration des Antigens gestoßen zu sein. Deshalb erscheint es zum Nachweis des Präzipitins nicht ratsam, Immunserum mit hohem Präzipitingehalt in unverdünnter Form zu verwenden.

Eine relativ zu starke Präzipitinkonzentration könnte die Ursache der negativen Ergebnisse oder der schwachen Präzipitationen sein, welche bei den unverdünnten Stufen und in den Anfangsverdünnungen der höhertitrigen Serumpräparationen mit mehreren Antigenen der Tabelle 12 vorliegen. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß bei weiterer Verdünnung des Serums die Präzipitationen an Intensität zunehmen, um bei höheren

Verdünnungsstufen wieder schwächer zu werden. Allerdings kann auch eine unterschiedliche Antigenlokalisation in den verwandten Bauchspeicheldrüsen nicht völlig ausgeschlossen werden. M a n s i und K i n g (17) haben jedoch festgestellt, daß 99% von 12, in nahezu 5000 Stückchen zerlegten, antigenhaltigen Bauchspeicheldrüsen Präzipitationen ergaben. Das häufigere Auftreten derartiger Reaktionen, wie sie Tabelle 12 zeigt, läßt es daher unwahrscheinlich erscheinen, daß diese ausschließlich durch unterschiedliche Antigenlokalisation hervorgerufen werden. Die Tatsache, daß diese Zonen schwacher oder negativer Reaktionen, faßt regelmäßig bei Präzipitationen zwischen schwachen Antigenen und Seren hoher Konzentration auftraten -bei gleichzeitiger Verlagerung der Banden nach dem Reservoir der schwächeren Reaktionskomponente hin- spricht dafür, daß diese Erscheinungen durch Antikörperüberschuß bedingt sind. Es handelt sich dabei offensichtlich um Reaktionen, wie sie als Zonenphänomen bei der Präzipitation, aber auch bei anderen serologischen Methoden bekannt sind.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß man hochkonzentrierte Immunseren nicht unverdünnt zum Antigennachweis verwenden sollte. Es wäre ratsam, mehrere Serumverdünnungen zum Nachweis von Viruspräzipitinogenen im Präzipitationstest zu benutzen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

In vorliegender Arbeit, die sich mit dem Präzipitationsverfahren nach O u c h t e r l o n y am Beispiel des Viruspräzipitinogens der klassischen Schweinepest und der korrespondierenden Antikörper beschäftigte, waren Fragen zur Verbesserung der diagnostischen Sicherheit des Testes Gegenstand näherer Untersuchungen.

- 1) Die günstigsten Voraussetzungen für ein Reaktionsoptimum im hexagonalen Präzipitationssystem nach K a m i n s k i , sind gegeben bei einem Durchmesser der zur Aufnahme der Reaktionspartner dienenden Agarstanzlöcher von 6 mm mit einem Fassungsvermögen von 0,04 - 0,05 ml und einem Randabstand von 4 - 5 mm.
- 2) Bei Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Präzipitationssystemen an Hyperimmunseren und an 221 Patientenseren zeigte sich dasjenige System überlegen, in welchem mit dem Antikörper-Additionsphänomen gearbeitet wurde. Ohne Anwendung dieses Phänomens würde etwa jedes siebente Serum mit schwacher präzipitierender Aktivität dem Nachweis entgehen. Außer diesem Additionseffekt bei unerschwelligem Präzipitiergehalt wurde auch in vorliegenden Untersuchungen eine allgemein beschleunigende und verstärkende Wirkung auf den Präzipitationsvorgang beobachtet.
- 3) Für den Nachweis des Antigens reicht die Präzipitinkonzentration der bisher benutzten Immunseren nicht aus. Antigene mit schwächerer präzipitinogener Aktivität können hiermit nicht regelmäßig erfaßt werden. Die Erhöhung des Präzipitin gehaltes nach Lyophilisation und anschließender Aufnahme in entsprechend geringeren Mengen an destilliertem Wasser oder insbesondere durch Ultrafilterdialyse führten zu Testpräparaten mit hoher präzipitierender Aktivität.
- 4) Aus den quantitativen Beziehungen zwischen Virusantigen und dem korrespondierenden Antikörper -die sich in der Intensität und Lage der Präzipitationsbanden widerspiegeln- ergaben sich durch die Verwendung hochkonzentrierter Seren in den unteren Verdünnungsstufen bei schwachen Antigenen ungünstige

Voraussetzungen für den Präzipitationsvorgang. Es traten teilweise negative Zonen oder Zonen schwächerer Präzipitationen auf. Diese Reaktionsergebnisse wurden als Zonenphänomen gedeutet.

- 5) Beim Nachweis des Präzipitinogens sollte daher nicht wie bisher mit unverdünnten Testseren gearbeitet werden. Zur Erfassung solcher Zonenphänomene bei Virusantigenen schwächerer präzipitinogener Aktivität empfiehlt sich die Verwendung mehrerer Serumverdünnungen.

- 17) Mansi, W.
King, A.A. "The study of swine Fever by the
Gel Diffusion Precipitin Test"
Vet. Rec. (1963)
- 18) Molnar, J. Mag. állator Lapja 2, 146 (1954)
- 19) Ouchterlony, Ö. "Diffusion-in-Gel Methods for Im-
munological analyses"
Progress in Allergy V, 1-78
(1958), Verlag: S. Karger, New York-
Basel
- 20) Paarmann, E.
Ernst, H. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69, 65
(1962)
- 21) Parlett, R.C.
Reher, C.A. "Further Studies on Gel Diffusion
Tests in Tuberculosis"
Ann. Rev. Resp. Dis. 80, 886
(1959)
- 22) Roitt, J.M.
Campbell, P.N.
Doniach, D. Biochem. J. 69, 248 (1958)
- 23) Schoop, G.
Wachendörfer, G. "Die Diagnose der klassischen
Schweinepest mit Hilfe des Agar-
gelverfahrens"
Mh. Tierhk. 15, 164 (1963)
- 24) Villemont, I.M.
Provost, A. Ann. Inst. Past. 96, 712 (1959)
- 25) Wachendörfer, G. persönl. Mitteilung
- 26) Wilson, M.W.
Pringle, B.H. J. Immun. 73, 232 (1954)
- 27) Woernle, H. "Erfahrungen mit der Präzipita-
tionsreaktion im festen Agarme-
dium bei der Diagnose von Virus-
krankheiten"
Mh. Tierhk. 13, 111 (1961)

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Prof. Dr. R. Altmann	Innere Medizin
Prof. Dr. W. Amelung	Innere Medizin
Prof. Dr. Dr. Dr. W. Artelt	Geschichte der Medizin
Prof. Dr. H. Betke	Hygiene und Arbeits- medizin
Priv. Doz. Dr. H. K. Brehm	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. H. Cramer	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. M. Czerny	Experimentalphysik
Prof. Dr. H. Dänzer	Angewandte Physik
Prof. Dr. K. Egle	Botanik
Prof. Dr. J. Frey	Innere Medizin
Prof. Dr. H. Frick	Anatomie
Prof. Dr. Frowein	Neurologie
Prof. Dr. A. Gebauer	Innere Medizin und Röntgenologie
Prof. Dr. R. Geißendörfer	Chirurgie
Prof. Dr. J. Gerchow	Gerichtliche und soziale Medizin
Prof. Dr. H. Giersberg	Zoologie
Prof. Dr. K. Greven	Physiologie
Prof. Dr. O. Grüner	Gerichtliche und soziale Medizin
Prof. Dr. E. Güntz	Orthopädie
Prof. Dr. E. Heinz	Vegetative Physiologie
Prof. Dr. L. Heller	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. W. Hellriegel	Medizinische Strahlen- kunde
Prof. Dr. F. Herrmann	Dermatologie
Prof. Dr. K. Herzberg	Hygiene und Bakterio- logie
Priv. Doz. Dr. H. H. Hirsch	Chirurgie
Prof. Dr. F. Hoff	Innere Medizin
Prof. Dr. P. Holtz	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. J. Hübener	Physiologische Chemie

Prof. Dr. J. Jürgens	Innere Medizin
Prof. Dr. O. Käser	Geburtshilfe und Gynäkologie
Prof. Dr. G. Kahlau	Pathologie
Priv. Doz. Dr. F. Kootz	Chirurgie
Prof. Dr. P. Kramp	Anthropologie
Prof. Dr. W. Krücke	Neuropathologie
Prof. Dr. C. Kulenkampff	Psychiatrie und Neurologie
Prof. Dr. E. Landes	Dermatologie
Prof. Dr. H. Lapp	Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
Prof. Dr. G. Leonhardi	Dermatologie
Prof. Dr. H. Lewin	Geburtshilfe und Gynäkologie
Prof. Dr. W. A. Lieb	Augenheilkunde
Prof. Dr. K. Luff	Gerichtliche und soziale Medizin
Prof. Dr. H. Martin	Innere Medizin
Prof. Dr. R. Mittermaier	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Prof. Dr. H. A. Muser	Physik
Prof. Dr. Ortmann	Anatomie
Priv. Doz. Dr. J. E. Otto	Augenheilkunde
Prof. Dr. K. L. Radenbach	Innere Medizin
Prof. Dr. Dr. Dr. Dr. B. Rajewsky	Biophysik und physikalische Grundlagen der Medizin
Prof. Dr. J. v. Reckow	Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Prof. Dr. W. Ried	Organische Chemie
Prof. Dr. G. Rossberg	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Prof. Dr. W. Rotter	Pathologie
Prof. Dr. P. Royen	Anorganische Chemie
Priv. Doz. Dr. O. Schmith	Sozialhygiene
Prof. Dr. R. Schneider	Anatomie
Priv. Doz. Dr. H. Schoberth	Orthopädie
Prof. Dr. A. W. Schwenzer	Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Prof. Dr. G. Schoop	Zoonosen

Prof. Dr. D. Starck	Anatomie
Prof. Dr. F. Strnad	Röntgendiagnostik
Prof. Dr. R. Thiel	Augenheilkunde
Prof. Dr. E. Ungeheuer	Chirurgie
Priv. Doz. Dr. W. Weber	Chirurgie und Urologie
Prof. Dr. K. Weiße	Kinderheilkunde
Prof. Dr. E. Westermann	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. K. Wezler	Physiologie
Priv. Doz. Dr. E. Wiedemann	Physikalische Therapie
Prof. Dr. T. Wieland	Organische Chemie
Prof. Dr. H. Zimmermann	Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
Prof. Dr. J. Zutt	Psychiatrie und Neuro- logie

Ehrenwörtliche Erklärung.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt a.M. zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Zur Anwendung der Ouchterlony - Technik bei
Virusinfektionen.

Versuche zur besseren Darstellung von Antikörpern und
Antigenen, dargestellt am Beispiel der klassischen
Schweinepest

im Institut für Zoonosenforschung
unter Leitung von Herrn Professor Dr. G. S c h o o p
mit Unterstützung durch Herrn Reg.vet.Rat. Dr. W a c h e n -
d ö r f e r

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung
der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation ange-
führten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen
Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht
noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die teilweise Veröffentlichung dieser Arbeit ist in Vorberei-
tung.

Darmstadt, den 19. Juli 1964

Judith Engelhardt

Lebenslauf

Am 14. November 1939 wurde ich als zweite Tochter des Regierungsveterinärrates Dr. Hermann Engelhardt und seiner Ehefrau Elisabeth Engelhardt, geborene Tauchen, in Asch, Sudetenland, geboren.

Im Herbst 1946 trat ich in die erste Klasse der Volksschule zu Rudingshain, Kreis Büdingen, ein. 1950 wurde ich nach bestandener Aufnahmeprüfung in die erste Klasse des Realgymnasiums in Schotten/Oberhessen aufgenommen. 1952 wechselte ich die Schule und besuchte von da an bis zur Ablegung der Reifeprüfung, zu Ostern 1959, das Gymnasium in Michelstadt im Odenwald.

Im Sommer-Semester 1959 begann ich das Studium der Medizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M. 1960 legte ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1961 ebenfalls an der Universität in Frankfurt a.M.

Im Februar 1963 wurde mir von Herrn Professor Dr. G. Schoop die vorliegende Dissertationsarbeit übertragen, welche ich im Juli 1964 beenden konnte.

Im Sommer-Semester 1965 habe ich die Ärztliche Prüfung an der Universität in Frankfurt a.M. abgelegt.

Darmstadt, den 29. Juli 1965

